

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04651

研究課題名(和文) 沖縄産等亜熱帯植物に由来する生物活性物質探索研究と代謝工学への展開

研究課題名(英文) Bioactive compounds from plants collected in Okinawa and subtropical areas, and their genetic engineering application

研究代表者

大塚 英昭 (Hideaki, Otsuka)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：00107385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品の6割は、何らかの形で天然素材に関連している。天然素材とは、植物、微生物、海産動物等由来である。天然から得られた成分はそのままの形で医療に供される場合もあるが、人が何らかの改変を行ってから、医療に供したり、天然物にヒントを得て、新しい医薬品を創造したりしている。本研究では植物を対象としており、植物相を勘案すると、亜熱帯、熱帯の資源が有望である。そのためには、まずは新規天然物または生物活性を有する化合物の探索を行う。そのような化合物が得られたら、その生合成遺伝子を突き止め、遺伝子改変等、遺伝子工学と呼ばれる手段で、新しい天然物、または非天然型の天然物を創出し、医療への応用を試みる。

研究成果の概要(英文)：About 60% of medicines, currently used, are related with natural products. Some are used as they are and some are derives or mimics of natural products. The first step is to explore new compounds or known ones with biological activities. The results mainly depend on choice of plants and when considered the thick density of plant species, those in the subtropical of tropical areas are quite promising. Thus, Okinawa and Ogasawara areas are chosen as candidates. The senior investigator of this project is engaged in the research for the plants collected in Okinawa. Okinawa area is considered as a biodiversity hot spot and thus many endemic plants wildly grow. New or biologically active compounds were investigated from plants collected in Okinawa islands or from other tropical areas. When such compounds were obtained from some plants, their biosynthetic genes are examined and the DNA of these plants is modified using genetic engineering method to produce unknown or unnatural compounds.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：生物活性天然物 沖縄 亜熱帯

### 1. 研究開始当初の背景

沖縄諸島と小笠原諸島はどちらも亜熱帯に分類され、日本における動植物の固有種、貴重種の宝庫であるが、それぞれの生物多様性は大きく性質を異にする。それは、沖縄諸島がかつて氷河期に大陸と陸続きであった大陸島であるのに対し(図1上)、小笠原諸島は陸続きにならなかったことがない海洋島であるという地誌的な違いによる。沖縄諸島は約150万年前に大陸と分断されたのに対し(図1上)、小笠原諸島は約4800万年前に、太平洋プレートのフィリピン海プレートへの潜り込みによって誕生した島(海洋性島弧といい、伊豆-小笠原弧の一部になる)である(図1下)。そのため、小笠原の生物は、すべて何らかの方法で島に偶然たどり着き、島の環境に適応して生き残ったものの子孫であり、本土と隔離された状態で独自の進化の道を歩み、多くが固有種へと進化した。

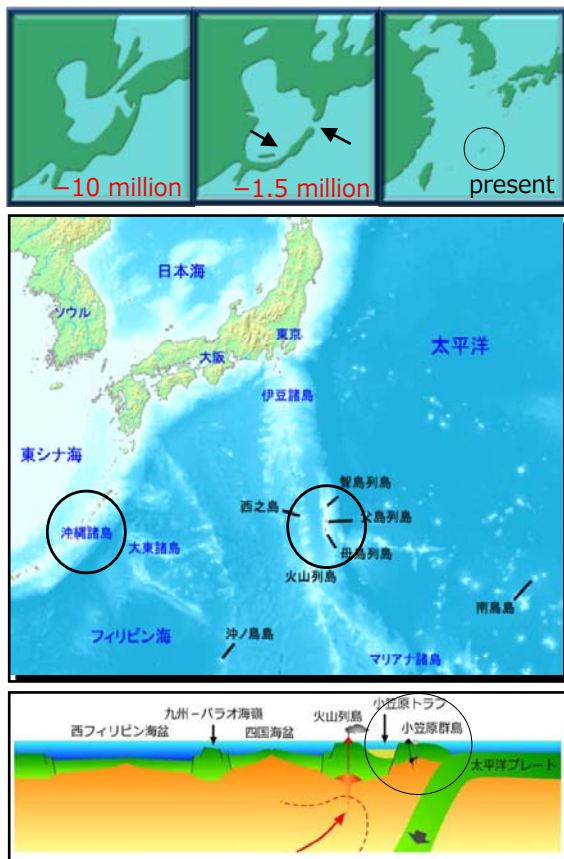


図1 沖縄および小笠原諸島

研究代表者は平成元年より一貫して沖縄亜熱帯植物を対象に研究を行ってきた。その理由は、沖縄には比較的固有種が多く、また、本土と気候が異なることから、たとえ同じ種であっても2次代謝産物が異なると予想したからである。この予想が正しかったことは業績目録にある多くの文献が物語っている。しかし、同じ様に亜熱帯であるものの、大陸島である沖縄の固有種率は約5%とされるのに対し、小笠原の植物は、約40%(樹木に限れば約70%)と高率であることが知られている。

このことは、小笠原産植物は沖縄産植物以上に魅力的な資源であることを示している。近年、生物多様性条約の締約や資源ナショナリズムの高まりによって、遺伝資源の国境内での囲い込みの流れが強くなりつつある。例えば日本の製薬会社が開発したタイ産植物由来の皮膚外用剤がタイの生物資源保護団体などから特許の無効性を問われ工業化に影響が出ている例や、米国で資源国から特許無効審判が提起され、実際に無効化された例があり、現在、海外生物資源へのアクセスは徐々に減少しつつあるといわれている(PATENT STUDIES 40(9) 36-47 (2005))。このような状況下にあつて、世界的にも類を見ない、我が国の沖縄、小笠原産植物に目を向け、創薬科学的見地から調査研究することは、我々日本の天然物化学者がなさねばならない喫緊の課題であると考えられる。

### 2. 研究の目的

日本から遠く離れた海外の植物資源は、我々天然物化学者にとって非常に魅力的なものである。しかし、近年、自国の資源は自国のために利用したいとする資源ナショナリズムの考えが広まり、海外の植物資源の採集は困難になりつつある。しかし、逆に我が国に存在する資源に関しては、海外の研究者はアクセスしづらく、我々日本人研究者にとって非常に有利な状況であると考えられることができる。本研究では、我が国有数の多様性と固有種を誇る沖縄および小笠原に産する亜熱帯植物資源に注目し、ゼブラフィッシュを用いたアッセイ系など種々の生物活性評価系により、医薬リード化合物の探索研究を推進する。また、絶滅危惧種や貴重種など、現在失われつつある植物資源の永続的な利用法として、毛状根培養による遺伝資源の保全と、異種遺伝子の導入による非天然型2次代謝系の構築を行い、新たな創薬資源としての有用性を検討したい。

### 3. 研究の方法

西表をふくむ沖縄諸島での採集は長年培った経験を生かして、速やかにかつ効率的に行う。これまでの採集に便宜を図っていただいた、琉球大学の与那演習林と西表にある全国共同利用施設である、熱帯圏生物研究センターをふたたび利用する予定である。小笠原諸島における調査採集にはこれまでは経験を有していない。現地におられる植物に造詣の深い先生と連絡を取って計画を進展させる予定である。小笠原諸島は昭和47年に国立公園に指定され、平成23年6月に世界遺産に登録された。小笠原は、東京から南に約1,000km離れた太平洋上に位置し、大小約30の島々から構成される。現在、東京から父島へは航空機は就航しておらず、約25時間の船旅が必要で、我々が上陸して採取可能な島は、この父

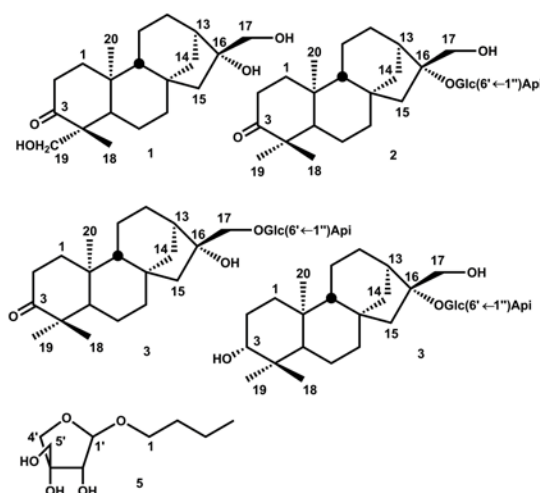
島と、さらに2時間の船旅が必要な母島である。本研究においては、自然公園法に基づいた許可申請などの手続きを事前に進め、適切な採集、輸送計画を立て、円滑に調査を進めたい。これには、申請者が長年行ってきた沖縄での採集調査の経験が役立つと考えている。まず、初年度早々に小笠原父島と母島への採集調査を行う。できるだけ多量少量の生物活性アッセイ用サンプルを採集する。また、固有種で比較的個体数の多いものについては、先に成分研究に必要なだけの葉を採集しておきたい。研究室に持ち帰ったサンプルは抽出物を調製し、死因のトップであるがんに関係するもの(ヒトがん細胞増殖抑制活性、がん多剤耐性抑制活性、ゼブラフィッシュを用いた血管新生阻害活性)とリーシュマニアに対する抑制活性など10種類余りの試験法により多面的に検討する「リーシュマニアは熱帯域で多数の患者が罹患し、WHOにより neglected tropical disease (経済的な発展が十分でなく企業利益が見込めないとして対応が遅れている疾患)にも指定」。この活性試験の結果は、次年度以降に行う各島における第2次採集調査の候補植物の選定に利用する。

第2次では前年に行った活性試験の結果に基づいて、数kgの葉の採集を行う。研究室に持ち帰ったサンプルは常法に従い、抽出、分配を行い、活性試験の結果を指標に、種々のカラムクロマトグラフィーによる分離・精製を行い、活性本体を突き止める。得られた化合物についてはNMRやMSなどのスペクトルデータ解析や、改良 Mosher 法、励起キラルティー法といった化学的誘導体化などの手法を組み合わせ、絶対配置を含む化学構造を明らかにする。

また、平成27年度と同様に今度は生物活性が見られた小笠原産植物について新鮮植物体の採取を行い毛状根の誘導を試みる(計画⑥)。小笠原諸島は人が島に入植した約180年前から現在に至るまで様々な動植物の導入・侵入による生態系の攪乱が続いている。海洋島は、このような外来生物の影響を受けやすく、固有種・希少種の減少が進行している。毛状根誘導化が成功すれば新たに自然から採取することもなく、実験室内で永続的に遺伝資源の保全が可能になる(全てではないものの毛状根から植物体の再生や人口種子としての応用も可能とされる)。

#### 4. 研究成果

リュウキュウガキはカキノキ科カキノキ属に分類される常緑中高木で東南アジア、太平洋諸島、台湾、日本では鹿児島、沖縄に分布している。果実は球形であり、熟すると黄褐色になる。果実は魚毒作用があり活性本体はナフトキノン誘導体とされている。リュウキュウガキの乾燥葉をメタノールで抽出し、常法に従って溶媒分配を行い、ブタノール可溶画分を得た。本画分を各種クロマトグラフィーで分離・精製を行い5種の新規化合物を得た(1-5)。得られた化合物は核磁気共鳴をはじめとする機器構造解析によりその構造を決定した。その結果、化合物1はエントカウレン型ジテルペンで2-4はその配糖体であると結論された。糖鎖アピオフラノシルグルコースであった。化合物5はブタノールのアピオシドであった。



ハドノキはイラクサ科ハドノキ属に分類され、伊豆半島以西や台湾に分布している。本植物からは希少骨格を有するハリマン型ジテルペンが単離されている。ハリマン型ジテルペンを生合成するジテルペン環化酵素のクローニングとその塩基配列の同定を行った。ハドノキ新鮮葉より抽出した総DNAを逆転写しcDNAを得、既知ジテルペン生合成遺伝子配列をもとに設計したdegenerateプライマーを用いて相動性の高い配列のクローニングを行った。その結果、約500bpの増幅が見られたことから、PCR産物をpBluescript IIにクローニングしuniversalプライマーを用いてシーケンシング反応を行い、塩基配列情報を得た。次に、得られた部分配列から設計したプライマーをもちいてinverse PCRを行いその全長を配列がクローニングできた。クローニングされた遺伝子配列を決定した。得られた遺伝子の推定アミノ酸配列はクワ科 *Morus otabilis* の *ent-copalyl diphosphate synthase* と73%の相同性を示していた。

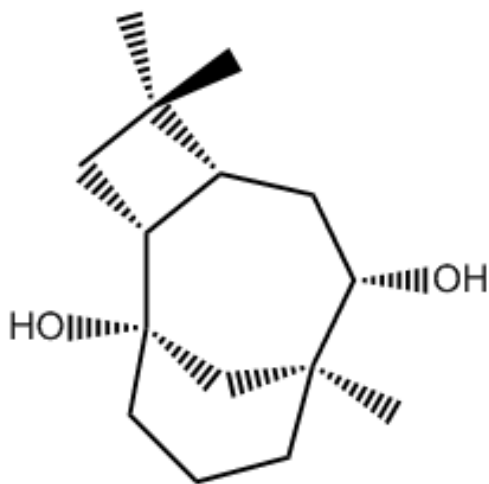
カーラウエークはツルイランイランノキと



も呼ばれる南方系植物でよい匂いを発することから、庭等に植えられ珍重されている。



同属植物がふるくマラリヤ、咳などの治療に用いられてきた、報告はあるが、当植物の詳細な成分検索はこれまでおこなわれていなかった。そこで、本植物の葉部の成分分析及び各種活性評価試験を通して、機能性成分について研究を行った。カーラウエーク乾燥葉部のメタノール抽出物を水に懸濁し酢酸エチルで分配して酢酸エチル化溶部を得た。本画分を各種クロマトグラフィーで精製して、新規化合物と1種を含む16種の化合物を単離した。新規化合物1は各種機器分析の結果、比較的単離例の少ないカロラン型のセスキテルペンであること事が判明し、2次元核磁気共鳴スペクトルを詳細に検討して構造をあきらかとした。本化合物には5箇所の立体不整存在し、それらの相対構造をNOESYスペクトルで解析し、絶対構造は2級水酸基にモッシャー変法を適用して決定した。

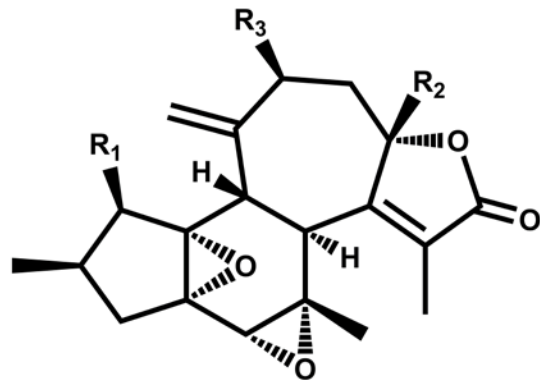


化合物 1

化合物 1 には A549 細胞に対してある程度の増殖抑制活性がみられたので、ターゲットたんぱく質の特定を試みた。ターゲットたんぱ

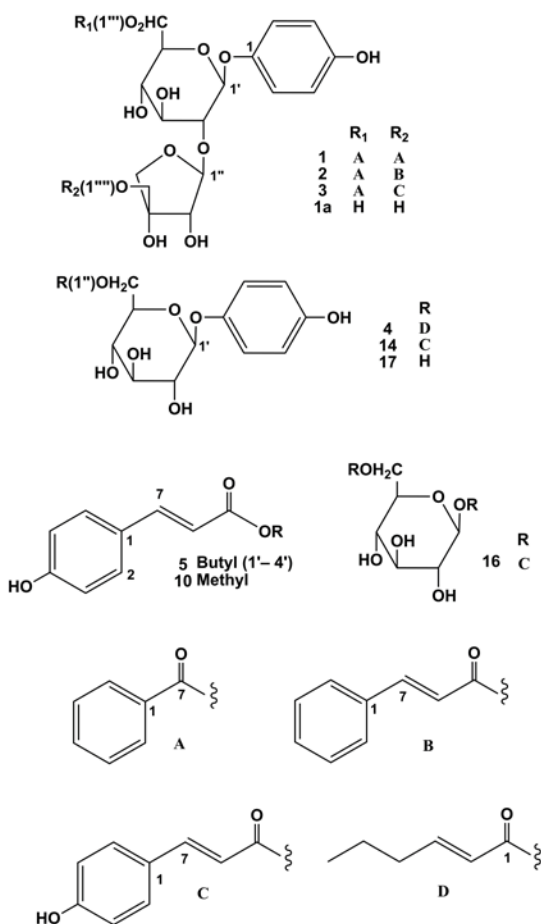
く質の特定にはこれまで、タグをつけて親和性クロマトグラフィー使われてきた。しかし、化学構造に変更を加えるため、本来の活性の低下や、新たな活性の出現等につながり可能性を否定できない。そこで、Drug affinity Responsive Target Stability法 (DARTS法) を用いることとした。その結果、標的たんぱく質として血管新生、細胞接着や移動、たんぱく質の恒常性維持、細胞膜の再生や修復に関するものが同定されるに至った。今後、がん細胞の遊走・浸潤に関する研究に発展できればとおもっている。

グミモドキ (*Croton cascarilloides*) はトウダイグサ科ハズ属に属する植物で、日本では鹿児島、沖縄に自生している。同植物の乾燥葉 6.53 kg を常法に従い抽出、分配を行い、得られた酢酸エチル可溶画分 100 g を各種カラムクロマトグラフィーを用いて分離、精製を行い新規化合物を得た。新規化合物はクロトフォラン骨格を有する、まれな構造をしていた。クロトフォラン基本構造を下に示している。



本化合物の生合成は図に示す様であると考え、その GGPP からの cyclization enzyme の遺伝子のクローニングを目的として、その後の生合成機構を明らかにするために、本植物の生葉を採集する必要に迫られた。そこで当該研究費を支弁して沖縄本島国頭郡に赴いた。生葉を採集して研究室に持ち帰り、現在 cDNA まで得ており、今後、酵素の構造の概要を明らかにする予定である。

オオシマコバンオキ (*Breynia officinalis*) はトウダイグサ科に属し、沖縄、台湾、南中国に分布している。本植物は傷や浮腫の際の塗り薬や過労の際の腸内出血の治療に用いられている。本植物のメタノール抽出物の酢酸エチル可溶画分より、次に示すような化合物を単離した。



これらの化合物の tyrosinase の阻害活性を測定したところ以下のものであった。

Tyrosinase Inhibitory Activity

Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	>200
2	>200
3	16.9 $\pm$ 2.3
4	>200
5	75.4 $\pm$ 6.1
6	>200
7	>200
8	>200
9	>200
10	143.6 $\pm$ 15.1
11	>200
12	>200
13	>200
14	69.1 $\pm$ 9.6
15	>200
16	156.6 $\pm$ 16.5
Arbutin (17)	86.1 $\pm$ 6.8
p-Coumaric acid	>200

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (N=3)

そこで活性の見られた

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計17件) 主な論文5件

① Dianthosaponins G–I, triterpene saponins, an anthranilic acid amide glucoside and a flavonoid glycoside from the aerial parts of *Dianthus japonicus* and their cytotoxicity Yuka Kanehira, Susumu Kawakami, Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami and Hideaki Otsuka: *Journal of Natural Medicines* **70**(04) 816-824 (2016) 査読有り

② Dianthosaponins G–I, triterpene saponins, an anthranilic acid amide glucoside and a flavonoid glycoside from the aerial parts of *Dianthus japonicus* and their cytotoxicity Yuka Kanehira, Susumu Kawakami, Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami and Hideaki Otsuka: *Journal of Natural Medicines* **70**(04) 816-824 (2016) 査読有り

③ Crotofolane-type diterpenoids, croto-cascarins L–Q, and a rearranged crotofolane-type diterpenoid, neocroto-cascarin, from the stems of *Croton cascarilloides* Susumu Kawakami, Masanori Inagaki, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Masatoshi Kawahata and Kentaro Yamaguchi: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **64**(10) 1492-1498 (2016) 査読有り

④ Microtropins Q–X, *ent*-labdane glucosides: microtropiosides G–I, ursane-type triterpene diglucoside and flavonol glycoside from the leaves of *Microtropis japonica* Saori Terazawa, Yuka Uemura, Yuka Koyama, Susumu Kawakami, Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Takakazu Shinzato, Masatoshi Kawahata and Kentaro Yamaguchi: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **65**(10) 930-939 (2017) 査読有り

DOI <http://doi.org/10.1248/cpb.c17-00459>

⑤ Phenolic compounds from the leaves of *Breynia officinalis*, and their tyrosinase and melanogenesis inhibitory activities Ayano Sasaki, Yoshi Yamano, Sachiko Sugimoto, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami and Takakazu Shinzato: *Journal of Natural Medicines* **72**(02) 381-389 (2018) 査読あり

DOI: [org/10.1007/s11418-017-1148-8](http://doi.org/10.1007/s11418-017-1148-8)

〔学会発表〕(計26件) 主な学会発表5件

①ハドノキ由来ジテルペン環化酵素のクロー

ニング

落葉尚子、杉本幸子、山野 喜、大塚英昭、松浪勝義

日本生薬学会第 62 回年会（岐阜）

平成 27 年 09 月 11 日 (2015)

② Phos-tag SDS PAGE を用いたリン酸化阻害物質の探索

曾根雄太郎、山野 喜、志賀もえみ、杉本 幸子、木下英司、木下恵美子、小池 透、大塚英昭、松浪勝義

日本薬学会第 136 年会（横浜）

平成 28 年 03 月 28 日 (2016)

③リュウキュウガキ葉部の成分研究（3）

川上 晋、稲垣昌宣、大塚英昭、松浪勝義

日本生薬学会第63回年会（富山）

平成28年09月25日 (2016)

④ヤマビワソウ (*Rhynchotechum discolor*)

地上部の抗*Leishmania*活性を指標とした成分検索

松井満生、杉本幸子、山野 喜、大塚英昭、松浪勝義

第56回日本薬学会中国四国支部学術大会（徳島）平成29年10月05日 (2016)

⑤ハシカンボク (*Bredia hirsuta*) 地上部の

抗*Leishmania*活性を指標とした成分探索

尾崎 葵、杉本幸子、山野 喜、大塚英昭、

松浪勝義 日本薬学会第138年会（金沢）

平成30年03月27日 (2018)

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hidjun.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 英昭 (OTSUKA Hideaki)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：00107385

(2) 研究分担者

川上 晋 (KAWAKAMI Susumu)

安田女子大学・薬学部・助教

研究者番号：10611311

杉本 幸子 (SUGIMOTO Sachiko)

広島大学・医歯薬保健学研究科（薬）・准教授

研究者番号：60549012

松浪 勝義 (MATSUNAMI Katsuyoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究科（薬）・教授

研究者番号：70379890

稲垣 昌宣 (INAGAKI Masanori)

安田女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90274480

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )